

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2014～2016
課題番号：26711008
研究課題名(和文) Photosystem IIプロトン移動経路の全容解明

研究課題名(英文) Proton transfer pathways in photosystem II

研究代表者
石北 央 (Ishikita, Hiroshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：00508111
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：PSII蛋白質の触媒部位Mn4CaO5と蛋白質表面を結ぶチャネル空間を全て明らかにした。このチャネル空間は、シアノバクテリア由来のPSII結晶構造と高等植物由来のPSII結晶構造の両方で解析した。また、PSIIのプロトン移動は電子移動と連動して起こる。電子移動経路のエナジェティクスも明らかにするため、モデル蛋白質の電子移動経路解析も行い、蛋白質内における長距離電子移動経路のエナジェティクスも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the channel, which proceed from the catalytic Mn4CaO5 cluster toward the protein bulk surface of photosystem II (PSII), using the cyanobacterial and plant PSII crystal structures. We also analyzed energetics of the electron transfer pathways in a model protein, because proton transfer is coupled with electron transfer in PSII.

研究分野：蛋白質、理論化学

キーワード：人工光合成 プロトン移動 光化学系II

1. 研究開始当初の背景

地球上の酸素は、光合成反応に関わる蛋白質 PSII によって水分解反応
 $2\text{H}_2\text{O}$ (基質) $\rightarrow \text{O}_2$ (生成物) + 4H^+ (副産物) + 4e^- (電子)

の結果生じる。PSII において、その触媒部位は Mn_4Ca クラスタと呼ばれる Mn_4 個と Ca_1 個が酸素によって架橋された錯体である。 Mn_4Ca クラスタは触媒サイトとして水分解に必須だが、一方で、 Mn_4Ca クラスタだけでは水分解反応は起こらない。水 2 分子を分解するには 4 つの「電子」を引き抜かなくてはならないが、電子は Mn_4Ca の電子アクセプターであるアミノ酸 D1-Tyr161 (TyrZ)、強力な酸化力を持つクロロフィル 2 量体 P680 による電子移動経路によって初めて基質水分子から引き抜くことができる。

それでは、同様に基質水分子から取り除かなくてはならない「副産物 H^+ (プロトン)」はどう取り除くのだろうか？蛋白質内部での反応の場合、溶液中の反応と異なり、副産物 H^+ は速やかに反応場から蛋白質外部に除去されなくてはならない。(H^+ が溜まってしまると反応は進みにくい。) Mn_4Ca クラスタ近傍の基質水分子の分解から生じた副産物 H^+ は、周辺のアミノ酸残基・水分子が水素結合ネットワークによってつながった H^+ 移動経路によって蛋白質の外へ除去されることで、水分解反応は滞りなく進むことができる。

2. 研究の目的

基質水分子は Mn_4Ca 近傍 (あるいは錯体構成要素の O として) 存在するはずであるが、候補数が多いこともあり、なかなか容易ではない。そこで、研究代表者は PSII 結晶構造に理論化学的手法を適用することで「水分解時副産物 H^+ を蛋白質外に排出するための PSII 内プロトン移動経路の全容解明」を行うことで、基質水分子の同定を試みる。全容解明とは、(1) プロトン移動を構成するアミノ酸残基・水分子の同定、(2) プロトン移動経路に沿ったエナジेटクス (例: プロトンの移動過程はどれほど下り坂か) (3) 経路のもつプロトン移動機構 (例: 一段階の協奏的プロトン移動過程か) 以上を最低限明らかにすることである。

3. 研究の方法

プロトン移動は蛋白質中の水素結合ネットワークを通じて起こるため、水素結合の様子をとらえやすい FTIR 等の振動分光法と、PSII 変異体作成を組み合わせる行うのが有効な実験手法である。しかし、PSII 蛋白質は 20 個あまりの蛋白質サブユニット複合体で

あり、結果の解釈は一筋縄でいかないことも多い。一方で蛋白質の機能は、その分子構造と密接に関わっている。蛋白質分子構造内の原子座標がわかれば、物理や化学の基本法則から、蛋白質分子内の相互作用を計算できる。そこで、本研究では PSII 蛋白質結晶構造 [Umena et al. (2011) Nature 473, 55] を利用し、その座標を元に実験的測定量を理論化学計算手法にて「測定」することで研究を進める。利用できるいくつかの理論化学計算手法のそれぞれの長所を生かす。汎用的な計算ソフトウェアでも優れた物は多く、それらを利用するため、研究代表者所有の計算機をベースに (その能力を大幅に増強しつつ) 積極的に利用して研究を進める。

4. 研究成果

量子化学計算手法「QM/MM 法」を利用して Mn_4Ca 錯体に対し、理論化学計算を行った。 Mn_4Ca 内には O5 とは別に O4 と呼ばれる別の酸素原子があり、複数の水分子が一行につながった「水分子の鎖」が直接水素結合をしている。理論化学計算の結果、これまで放出サイトと考えられてきた O5 ではなく、O4 が、近接している「水分子の鎖」を通じて、水素イオンを容易に放出できることを発見した。この「水分子の鎖」は、近年明らかにされていた全ての X 線結晶構造解析結果においてその存在が確かめられており、O4 を水素イオン放出サイトとする結果は、結晶構造解析の結果と矛盾しなかった。また、X 線による結晶構造解析の結果を大幅に修正しないかぎり、O5 近傍に水分子の存在を仮定することは分子化学的に無理があることも示した。さらに、今回明らかになった第 1 段階反応によって、(1) 重水置換効果の影響を受けにくい、(2) 活性化エネルギーがとりわけ低い、(3) 光の照射がなくても水素イオン移動が起こる、等の実験事実を矛盾なく説明することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 10 件)

1. Naoki Sakashita, Hiroshi C. Watanabe, Takuya Ikeda, Keisuke Saito, and Hiroshi Ishikita*

Biochemistry (2017) doi:

10.1021/acs.biochem.7b00220

“Origins of water molecules in the photosystem II crystal structure”

2. Keisuke Kawashima and **Hiroshi Ishikita***
Biochemistry (2017) doi: 10.1021/acs.biochem.7b00082
“Structural factors that alter the redox potential of quinones in cyanobacterial and plant photosystem I”
 3. Ryo Hasegawa, Keisuke Saito, Tomohiro Takaoka, and **Hiroshi Ishikita***
Photosynth. Res. (2017) doi: 10.1007/s11120-017-0382-y
“pK_a of ubiquinone, menaquinone, phylloquinone, plastoquinone, and rhodoquinone in aqueous solution”
 4. Hiroshi C. Watanabe, Yuki Yamashita, and **Hiroshi Ishikita***
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **114** (2017) 2916-2921 [direct submission, edited by A. Warshel]
“Electron transfer pathways in a multi-heme cytochrome MtrF”
 5. Naoki Sakashita, Hiroshi C. Watanabe, Takuya Ikeda, and **Hiroshi Ishikita***
Photosynth. Res. (2017) doi: 10.1007/s11120-017-0347-1
“Structurally conserved channels in cyanobacterial and plant photosystem II”
 6. Kento Motoyama, Hideaki Unno, Ai Hattori, Tomohiro Takaoka, **Hiroshi Ishikita**, Hiroshi Kawaide, Tohru Yoshimura, and Hisashi Hemmi*
J. Biol. Chem. **292** (2017) 2457-2469
“A single amino acid mutation converts (R)-5-diphosphomevalonate decarboxylase into a kinase”
 7. Keisuke Saito*, Naoki Sakashita, and **Hiroshi Ishikita**
Aust. J. Chem. **69** (2016) 991-998
“Energetics of the proton transfer pathway for tyrosine D in photosystem II”
 8. Tomohiro Takaoka, Naoki Sakashita, Keisuke Saito, and **Hiroshi Ishikita***
J. Phys. Chem. Lett. **7** (2016) 1925-1932
“pK_a of a proton conducting water chain in photosystem II”
 9. Keisuke Saito, A. William Rutherford, and **Hiroshi Ishikita***
Nat. Commun. **6:8488** (2015) doi: 10.1038/ncomms9488
“Energetics of proton release on the first oxidation step in the water oxidizing enzyme”
 10. Keisuke Saito and **Hiroshi Ishikita***
Biochim. Biophys. Acta **1837 (Bioenergetics)** (2014) 159-166
“Influence of the Ca²⁺ ion on the Mn₄Ca conformation and the H-bond network arrangement in Photosystem II”
- 〔学会発表〕(計15件)
1. 【国際・招待講演(イントロダクトリー・スピーカー)】UK-Japanese Frontiers of

**Science Symposium (UK-Japan FoS
日英先端科学シンポジウム)**

2016年11月7~9日、Chicheley Hall, UK

Hiroshi Ishikita “Water-splitting enzyme photosystem II, a model for artificial photosynthesis”

http://www.jsps.go.jp/j-bilat/fos_juk/jishi_02.html

**2. 【国際・招待講演 (Keynote lecture)】
International Conference on
Photochemical Conversion and Storage
of Solar Energy**

2016年7月24~29日、Saint-Petersburg, Russia

Hiroshi Ishikita “Energetics of proton release on the first oxidation step in the water oxidizing enzyme”

<http://www.ips21-spb.com/>

**3. 【国際・招待講演】Protein Electrostatics
Berlin 2016**

2016年7月19~21日、Berlin, Germany

Hiroshi Ishikita “Proton transfer reactions in water oxidizing enzyme Photosystem II”

<http://www.electrostatics-berlin.de/>

**4. 【招待講演】生物学若手研究者の集い
(若手会)・夏のセミナー**

2016年7月16~17日、ホテルコンチネンタル府中

石北 央 「電子伝達蛋白質がつなぐもの」

http://www.sbj.or.jp/event/young_summer_seminar2016.html

**5. 【国際・招待講演】International
Conference Photosynthesis Research for
Sustainability**

2016年6月19~26日、Pushchino, Russia

Hiroshi Ishikita “Energetics of proton release on the first oxidation step in the water oxidizing enzyme”

<http://photosynthesis2016.cellreg.org/Home.php>

**6. 【招待講演】第1回つくば-柏-本郷イノベーション
セッションコリドー・ナノバイオパネル
「データ駆動科学、バイオロジーへの挑
戦」**

2016年6月17日、東京大学 伊藤国際学術研究センター

石北 央 「光合成水分分解反応に関わる photosystem II の結晶構造から言えるメカニズム」

<http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/images/uploads/pdf/gakuyogosymposium-final.pdf>

**7. 【世話人・招待講演】大阪大学蛋白質研
究所セミナー**

**「構造を基盤とする蛋白質科学における
未解決問題」**

2016年3月1~2日、東京大学 先端科学技術研究センター 3号館南棟 ENEOSホール

石北 央 「蛋白質結晶構造では見えない H⁺が語る化学」

<http://www.protein.rcast.u-tokyo.ac.jp/ta npakuken2016/>

**8. 【招待講演】水和ナノ構造研究会(公益
財団法人 新世代研究所)**

**「構造を基盤とする蛋白質科学における
未解決問題」**

2015年3月12日、新世代研究所、千代田区

石北 央 「蛋白質環境におけるプロトン移動と水素結合ネットワーク」

9. 【国際・招待講演】2014 International Conference on Artificial Photosynthesis

2014年11月24~28日、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場

Hiroshi Ishikita “Proton transfer reactions in Photosystem II”

<http://artificial-photosynthesis.net/ICAR P2014/speakers.html>

10. 【国際・招待講演】XIXth International Workshop on Quantum Systems, in Chemistry, Physics and Biology (QSCP XIX)

2014年11月11~17日、Fullon Hotel Tamsui Fishermen's Wharf, Taipei

Hiroshi Ishikita “Proton transfer reactions and hydrogen bond networks in protein environments”

<http://qscp2014taipei.chem.sinica.edu.tw/program.php>

11. 【招待講演(プレナリーレクチャー)】CBI学会 2014年大会

「iPS, ion channel, in silico が拓く、新しい創薬パラダイム」

2014年10月28~30日、タワーホール船堀
石北 央「蛋白質環境におけるプロトン移動と水素結合ネットワーク」

<http://cbi-society.org/taikai/taikai14/index.html>

12. 【国際・招待講演】1st UK-Japan bilateral workshop on solar fuel (日英セミナー)

2014年9月18~19日、駐日英国大使館

Hiroshi Ishikita “Proton transfer reactions and hydrogen-bond networks in protein environments”

13. 【国際・招待講演】Computational

Science Workshop 2014 (CSW2014)

2014年8月20~22日、Tsukuba International Congress Center

Hiroshi Ishikita “Proton transfer reactions and hydrogen-bond networks in protein environments”

<https://unit.aist.go.jp/nri/event/csw2014/>

14. 【招待講演】第14回日本蛋白質科学会年会ワークショップ

「スマートプロテインデザイン：次世代蛋白質工学を目指して」

2014年6月25~27日、ワークピア横浜

石北 央「蛋白質の静電場環境による活性のコントロール」

<http://www.aeplan.co.jp/pssj2014/>

15. 【招待講演】第4期第5回フロンティアサロン

2014年5月19日、ホテルニューオータニ東京

石北 央「結晶構造では見えにくい「H⁺」から蛋白質の反応を見る」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.protein.rcast.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石北 央 (ISHIKITA HIROSHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：00508111

(2) 研究分担者

該当せず

研究者番号：

(3)連携研究者 該当せず
該当せず

研究者番号：

(4)研究協力者
該当せず